

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Детушева Е. В.¹, Фурсова Н. К.¹, Коровкин С. А.²

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ДИОКСИДИНА И ДИОКСИДИН-СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА «НОСОЛИН-УЛЬТРА, КАПЛИ НАЗАЛЬНЫЕ»

¹ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Московская обл., Россия;
²ЗАО «ФИРН-М», 142279, Оболенск, Московская обл., Россия

Изучена антимикробная активность антисептика диоксидина и комплексного диоксидин-содержащего препарата «Носолин-ультра, капли назальные» против планктонных и биоплёночных культур возбудителей ЛОР-инфекций, изучение динамики формирования микробной устойчивости к диоксидину. В работе использованы 11 референс-штаммов и 9 клинических штаммов микроорганизмов: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus luteus*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter pittii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*. Антимикробную активность препаратов против планктонных культур определяли методом серийных разведений в бульоне и спот-методом на плотных питательных средах, против биоплёнок – методом аппликаторов. Динамику формирования устойчивости к диоксидину изучали, пассируя культуры в жидкой питательной среде с возрастающими концентрациями антисептика. Выявлено, что Диоксидин проявлял антимикробную активность против планктонных клеток всех штаммов (МБК=0,08-5 мг/мл), кроме *S. pyogenes* SN345 (МБК>5 мг/мл), подавлял рост сформированных биоплёнок (МБК=0,08-2,5 мг/мл) всех штаммов, кроме *S. pyogenes* SN345 (МБК>5 мг/мл). Препарат «Носолин-ультра, капли назальные» высокоактивен против планктонных клеток (МБК=0,04-0,63 мг/мл) и биоплёнок (МБК=0,02-0,31 мг/мл) грамотрицательных бактерий, кроме *A. pittii* (МБК>2,5 мг/мл), менее активен – против планктонных клеток (МБК=1,25-2,5 мг/мл) и биоплёнок (МБК=0,02-0,31 мг/мл) грамположительных бактерий и *C. albicans*. Один штамм (*S. aureus*) сформировал вариант, устойчивый к диоксидину в концентрации 20 мг/мл, что превысило концентрацию диоксидина в комплексном препарате, другие штаммы (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*) таких вариантов не сформировали. Препарат «Носолин-ультра, капли назальные» может быть эффективно использован против большинства возбудителей ЛОР-инфекций. При длительном использовании препарата для некоторых видов ЛОР-патогенов в перспективе может быть отмечено незначительное снижение эффективности.

Ключевые слова: диоксидин; антимикробная активность; ЛОР-инфекции; планктонные бактерии; биоплёнки

Для цитирования: Детушева Е. В., Фурсова Н. К., Коровкин С. А. Антимикробная активность диоксидина и диоксидин-содержащего препарата «Носолин-ультра, капли назальные». Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65(4): 244-250. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-4-244-250>

Detysheva E. V.¹, Fursova N. K.¹, Korovkin S. A.²

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF DIOXIDINE AND DIOXIDINE-CONTAINING MEDICINE «NOSOLIN-ULTRA, NASAL DROPS»

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia;

²CJSC «FIRN-M», Obolensk, Moscow region, Russia

The study is devoted to the study of the antimicrobial activity of the antioxidant dioxidin and the complex dioxin-containing preparation Nosolin-ultra, nasal drops against planktonic and biofilm cultures of pathogens of ENT infections, the dynamics of the formation of microbial resistance to dioxidine. 11 reference strains and 9 clinical strains of microorganisms were used in the study: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus luteus*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter pittii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. The antimicrobial activity of preparations against planktonic cultures was determined by serial dilution in broth and spot method on solid nutrient media, against biofilms by the applicator method. The dynamics of dioxidine resistance formation was studied by passaging cultures in a liquid nutrient medium with increasing concentrations of antiseptic. Based on the study, it was found that Dioxidin showed antimicrobial activity against plankton cells of all strains (MBC=0.08-5 mg/ml), except *S. pyogenes* SN345 (MBC>5 mg/ml), inhibited the growth of formed biofilms (MBC=0.08-2.5 mg/ml) of all strains except *S. pyogenes* SN345 (MBC>5 mg/ml). The drug «Nosolin-ultra, nasal drops» was highly active against plankton cells (MBC=0.04-0.63 mg/ml) and biofilms (MBC=0.02-0.31 mg/ml) of gram-negative bacteria, except *A. pittii* (MBC>2.5 mg/ml), less active against plankton cells (MBC=1.25-2.5 mg/ml) and biofilms (MBC=0.02-0.31 mg/ml) of gram-positive bacteria and *C. albicans*. One strain (*S. aureus*) formed a variant resistant to dioxidine at a concentration of 20 mg/ml, which exceeded the concentration of dioxidine in the complex preparation; other strains (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*) did not form such variants. The data obtained indicate that the drug «Nosolin-ultra, nasal drops» can be effectively used against most pathogens of ENT infections. It is worth noting that with prolonged use of the drug for some types of ENT pathogens in the future, a slight decrease in effectiveness may be noted.

Key words: bacterial resistance; nosocomial infections; planktonic bacteria; biofilm.

For citation: *Detusheva E.V., Fursova N.K., Korovkin S.A. Antimicrobial activity of dioxidine and a dioxidin-containing preparation «Nosolin-Ultra, nasal drops». Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (4): 244-250 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-4-244-250>*

For correspondence: *Detusheva Elena Vladimirovna*, Ph.D. biol. Sci., Researcher, Department of Molecular Microbiology, Laboratory of Antimicrobial Preparations; e-mail mail: detushevaev@obolensk.org

Information about authors:

Detysheva E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3478-6534>

Fursova N.K., <http://orcid.org/0000-0001-6053-2621>

Korovkin S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7890-4366>

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 28.11.2019
Accepted 19.12.2019

В патологии ЛОР-органов важное место занимают инфекции верхних дыхательных путей, которые актуальны практически для всех категорий населения [1, 2]. Согласно статистическим отчётам Минздрава России, ежегодно регистрируются до 50 млн. случаев инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей, среди которых около 10% составляют острые респираторные инфекции невирусной природы [3]. Заболевания верхних дыхательных путей и ЛОР-органов составляют 15% у пациентов амбулаторно-поликлинического звена Российской Федерации [4, 5].

Бактерии редко являются первопричиной инфекции ЛОР-органов, они часто вызывают осложнения после вирусного заболевания [6-8]. Среди основных этиологических агентов, вызывающих бактериальное поражение верхних дыхательных путей, важную роль играют *Streptococcus pneumoniae* (20-35%) и *Haemophilus influenzae* (6-26%) при остром риносинусите и обострении хронического риносинусита [9, 10]. Более редкими возбудителями риносинусита являются *Moraxella catarrhalis* и другие грамотрицательные бактерии (0-24%), *Streptococcus pyogenes* (1-3%, до 20% – у детей), *Staphylococcus aureus* (0-8%), анаэробы (0-10%) [11, 12].

Грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. редки в качестве возбудителей острого синусита, но их роль существенно возрастает в госпитальных условиях для пациентов стационаров, у иммунокомпрометированных лиц (нейтропения, СПИД), у пациентов, получавших повторные курсы антибактериальной терапии [13, 14]. *H. influenzae*, реже *S. pneumoniae*, представители порядка *Enterobacterales*, неспорообразующие анаэробы, составляющие 5-10% от всех возбудителей гайморита и одонтогенного верхнечелюстного синусита, являются актуальными этиологическими агентами для ЛОР-инфекций [3, 15].

В ряде исследований описан высокий уровень персистенции возбудителей инфекций в организме человека, способствующий развитию носительства и рецидивов инфекции ЛОР-органов. При этом существенно возрастает уровень приобретённой антибиотикорезистентности патогенов, обуславливающий ухудшение состояния пациента, усложняющий и замедляющий лечение и достижение эрадикации бактериальных патогенов [16-18].

Важную роль в патогенезе инфекций ЛОР-органов играет способность возбудителей инфекций к образованию биоплёнок. Все основные респираторные патогены

способны к образованию биоплёнок в организме человека [19]. Их наличие объясняет такие патологические состояния как хронический средний отит и хронический аденотонзиллит [15, 20].

Поиск новых лекарственных средств, обладающих способностью разрушать сформированные биоплёнки и препятствовать образованию новых биоплёнок, является актуальной задачей для фармакологии и клинической практики [21, 22]. Диоксидин и препараты на его основе могут рассматриваться как перспективные средства для лечения инфекционных заболеваний ЛОР-органов.

Цель исследования – оценка антибактериальной активности диоксида и комплексного препарата «Носолин-ультра, капли назальные» против микроорганизмов – возбудителей ЛОР-инфекций – в планктонном состоянии и в форме бактериальных биоплёнок, изучение динамики формирования линий микроорганизмов, устойчивых к диоксидину, при селективном давлении препарата.

Материал и методы. Антибактериальные препараты. Диоксидин, 10 мг/мл (Фирн-М, Россия). Препарат «Носолин-ультра, капли назальные», содержащий диоксидина 10 мг/мл, дексаметазона 1 мг/мл, ксилометазолина 1 мг/мл (Фирн-М, Россия).

Штаммы микроорганизмов. Референс-штаммы микроорганизмов получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk»: штаммы грамположительных бактерий *Streptococcus pyogenes* NCTC8198 (B-4806), *Streptococcus agalactiae* ATCC12386 (B-7829), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B-2931), *Staphylococcus saprophyticus* CCM883 (B-4638), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (B-4510); штаммы грамотрицательных бактерий *Moraxella catarrhalis* ATCC25238 (B-7454), *Haemophilus influenzae* ATCC10211 (B-10211), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (B-4890), *Klebsiella pneumoniae* 9633 NCTC/ATCC 13883 (B-4811), *Proteus vulgaris* OX 19 ATCC 9484 (B-7564) и дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC10231 (B-7617). Клинические штаммы микроорганизмов, выделенные из клинических образцов при исследовании случаев инфекций в 2016-2017 гг., получены из рабочей коллекции лаборатории антимикробных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ: штаммы грамположительных бактерий *S. pyogenes* SN345, *S. aureus* 7775, *Micrococcus luteus* №1; штаммы грамотрицательных бактерий *M. catarrhalis* №1, *P. aeruginosa* B-86/17, *K. pneumoniae* B-86/18, *P. mirabilis* B-417/16, *Acinetobacter pittii* №6 и дрожжеподобных грибов *C. albicans* №16.

Идентификация микроорганизмов. Для видовой идентификации микроорганизмов использовали коммерческие API системы (bioMérieux, Франция), автоматический анализатор Vitek 2 Compact (bioMérieux, Франция) и масс-спектрометр MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

Культивирование микроорганизмов. Для выращивания микроорганизмов использовали агар и бульон ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), питательную среду ГБМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), агар и бульон Мюллера-Хинтон (Himedia, Мумбаи, Индия) и среду ГБМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) [23]. Культивирование планктонных форм микроорганизмов проводили в течение 20–24 ч при температуре 37 °С, био-пленок – в течение 168 ч при температуре 37 °С.

Культивирование био-пленок. Выращивание био-пленок тест-штаммов микроорганизмов проводили в 96-луночных планшетах, интенсивность био-пленкообразования определяли с помощью окрашивания генцианом фиолетовым (HiMedia Laboratories, Индия) [24]. Кратко, процедура окрашивания включала в себя следующие процедуры: осторожное удаление остатков питательной среды с неприкрепившимися планктонными клетками; промывку био-пленок в течение 2–3 мин стерильным буфером PBS (Merck, Германия) в том же объеме, в котором проходило культивирование; внесение в лунки планшета по 200 мкл отфильтрованного 0,1 %-ного раствора генциан фиолетового; окраску био-пленки красителем в течение 10–15 мин при комнатной температуре; удаление красителя и промывку PBS буфером; удаление остатков буфера и высушивание; экстракцию красителя из био-пленок раствором этанола-изопропанола (1:1) в объеме 200 мкл в течение 2–3 мин; перенос спиртового экстракта в чистый плоскодонный планшет; измерение оптической плотности суспензии при длине волны 590 нм на приборе xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, США). Результаты измерений интерпретировали, сравнивая показатели OD₅₉₀ образцов с таковым негативного контроля. Отсутствие био-пленки фиксировали при $OD_{образца} \leq OD_{контроля}$, слабую степень продукции био-пленки – при $OD_{образца} < OD_{контроля}$, среднюю степень продукции био-пленки – при $2 \cdot OD_{контроля} < OD_{образца} \leq 4 \cdot OD_{контроля}$, высокую степень продукции био-пленки – при $4 \cdot OD_{контроля} < OD_{образца}$, в соответствии с рекомендациями Rodrigues et al., 2010 [25]. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Оценка антибактериальной активности препаратов для планктонных клеток. Чувствительность планктонных клеток микроорганизмов к изучаемым препаратам определяли методом серийных разведений на агаре [26]: на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения диоксидина (от 5 до 0,04 мг/мл) и препарата «Носолин-ультра, капли назальные» (от 2,5 до 0,08 мг/мл), наносили 10 мкл бактериальной суспензии тестируемого штамма в концентрации 10⁷ КОЕ/мл и оставляли до полного впитывания микрокапли. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) принимали минимальную концентрацию препарата в питательной среде, при которой отсутствовал рост тест-культуры.

Оценка антибактериальной активности препаратов для био-пленок. Чувствительность био-пленок микроорганизмов к изучаемым препаратам определяли методом аппликаторов [26]: поверхность питательного

агара, не содержащего антимикробных препаратов, засеивали 0,1 мл суспензии исследуемой тест-культуры в концентрации 10⁹ КОЕ/мл. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч, после чего на поверхность бактериального газона накладывали при помощи стерильного пинцета стерильный целлюлозный аппликатор (7×7 мм) на 2–3 мин. Затем аппликатор с отпечатком культуры переносили стерильным пинцетом на поверхность агара в чашки Петри с питательной средой, содержащей серийные разведения диоксидина (от 5 до 0,04 мг/мл) или препарата «Носолин-ультра, капли назальные» (от 2,5 до 0,08 мг/мл), в ориентации «вниз бактериальным отпечатком». Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч, учитывали результаты. За МБК принимали минимальную концентрацию препарата, при которой отсутствовал рост культуры на аппликаторе и вокруг него.

Селекция бактерий, устойчивых к диоксидину. Селекцию устойчивых вариантов микроорганизмов осуществляли путем последовательных пересевов бактериальной культуры в новые порции питательного бульона, содержащего ступенчато повышающиеся концентрации препарата, начиная с концентрации, в два раза меньшей МБК [27]. Для этого готовили серию двукратных разведений препарата в объеме 4 мл питательного бульона и вносили в каждую пробирку по 50 мкл бактериальной культуры и инкубировали при температуре 37 °С. После 2–3 дней инкубации из пробирки с максимальной концентрацией препарата, в которой наблюдался бактериальный рост, отбирали порцию 50 мкл и пересевали в новую серию пробирок с более высокими концентрациями диоксидина. Процесс селекции продолжали до момента, когда прекращалось увеличение значения МБК для данной культуры в течение пяти пересевов. Оценивали показатель МБК диоксидина для тест-культур в планктонном состоянии и сравнивали его с концентрацией диоксидина в комплексном препарате «Носолин-ультра капли назальные». При значении МБК ≤ 10 мг/мл делали вывод об эффективности комплексного препарата против данного штамма.

Детекция генов антибиотикорезистентности. Гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, интегразы класса 1 (*int1*) и класса 2 (*int2*) и наборы генных кассет класса 1 (*ins1*) и класса 2 (*ins2*) определяли методом ПЦР [28] в клинических штаммах бактерий.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010. Результаты экспериментов были представлены как средняя величина и стандартное отклонение (ошибка среднего).

Результаты. В ходе исследования был использован разработанный нами ранее методический подход, позволяющий проводить сравнительный анализ чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, в планктонном состоянии и для био-пленок [26].

Антимикробная активность диоксидина и препарата «Носолин-ультра капли назальные» против планктонных клеток возбудителей ЛОР-инфекций. Препарат диоксидин проявлял антимикробную активность против планктонных клеток всех использованных в работе грамотрицательных бактерий с МБК от 0,04 до 0,63 мг/мл, кроме клеток штамма *A. pittii* № 6 (МБК=5 мг/мл). Стоит особо подчеркнуть, что анти-

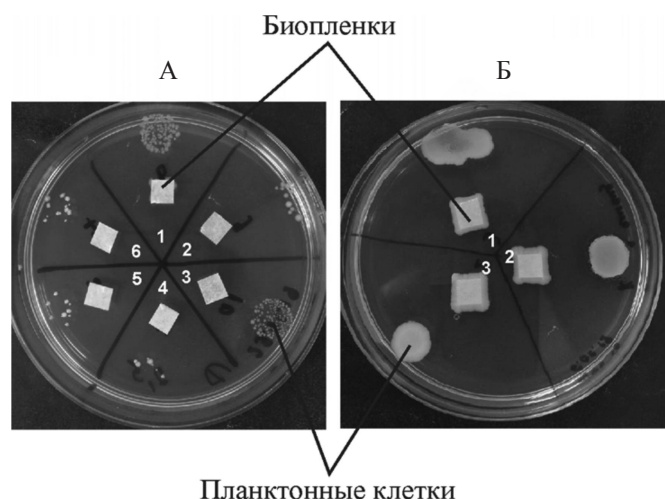


Рис. 1. Планктонные клетки и биопленки. А – отсутствие роста биопленок *S. aureus* ATCC25923 (1), *S. aureus* В- 7775 (2), *S. saprophyticus* ССМ883 (3), *S. epidermidis* ATCC14990 (4), *K. pneumoniae* ATCC700603 (5) и *P. aeruginosa* ATCC27853 (6), на питательной среде Мюллера-Хинтон, содержащей 0,63 мг/мл диоксицина, на аппликаторах (биопленки) и в микрокаплях (планктонные клетки); Б – наличие роста биопленок *S. aureus* ATCC25923 (1), *S. aureus* В- 7775 (2), *S. saprophyticus* ССМ883 (3) на питательной среде Мюллера-Хинтон, содержащей 0,08 мг/мл диоксицина.

Таблица 1
Оценка интенсивности биопленкообразования тест-штаммами микроорганизмов

Штаммы микроорганизмов	OD ₅₉₀	Степень образования биопленки
Референс-штаммы		
<i>S. pyogenes</i> NCTC8198	0,369	высокая
<i>S. agalactiae</i> ATCC12386	0,345	средняя
<i>S. aureus</i> ATCC25923	0,383	высокая
<i>S. saprophyticus</i> ССМ883	0,169	средняя
<i>S. epidermidis</i> ATCC14990	0,391	высокая
<i>M. catarrhalis</i> ATCC25238	0,255	средняя
<i>H. influenzae</i> ATCC10211	0,199	слабая
<i>P. aeruginosa</i> ATCC10145	0,377	высокая
<i>K. pneumoniae</i> ATCC13883	0,452	высокая
<i>P. vulgaris</i> ATCC9484	0,399	высокая
<i>C. albicans</i> ATCC10231	0,301	средняя
Клинические штаммы		
<i>S. pyogenes</i> SN345	0,299	средняя
<i>S. aureus</i> 7775	0,303	высокая
<i>M. catarrhalis</i> № 1	0,454	высокая
<i>M. luteus</i> № 1	0,468	высокая
<i>P. aeruginosa</i> В-86/17	0,368	высокая
<i>A. pittii</i> №6	0,338	средняя
<i>K. pneumoniae</i> В-86/18	0,383	высокая
<i>P. mirabilis</i> В-417/16	0,368	высокая
<i>C. albicans</i> № 16	0,341	средняя

септик проявлял активность против штаммов, несущих генетические детерминанты антибиотикорезистентности и имеющих фенотип множественной лекарственной устойчивости (MDR). Например, для штаммов

K. pneumoniae В-86К/17-1 и *P. mirabilis* В-417/16, несущих гены бета-лактамаз bla_{TEM-1} , bla_{SHV-11} , $bla_{CTX-M-15}$ и интегроны класса 1 $int1(dfrA17-aadA5)$ и $int1(dfrA1-orfC)$, а также интегрон класса 2 $int2(dfrA1-sat2-aadA1)$, МБК диоксицина составила 0,31-0,63 мг/мл.

Меньший уровень активности препарата отмечен против штаммов грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов *C. albicans* (МБК от 1,25 до >2,5 мг/мл), кроме планктонных клеток штамма *S. pyogenes* SN345, МБК диоксицина для которого составила 5 мг/мл (рис. 1).

Комплексный препарат «Носолин-ультра, капли назальные» также проявлял высокий уровень активности против планктонных клеток грамотрицательных бактерий (МБК=0,04-0,63 мг/мл), кроме клеток штамма *A. pittii* (МБК=2,5 мг/мл), и меньший уровень активности против планктонных клеток грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов *C. albicans* (МБК от 1,25 до >2,5 мг/мл).

Оценка интенсивности биопленкообразования тест-штаммами микроорганизмов. Использованный в ходе работы стандартный метод окрашивания биопленок генцианом фиолетовым, с последующей экстракцией красителя, позволил оценить уровень интенсивности биопленок, образованных клетками изучаемых штаммов микроорганизмов. Показано, что 12 штаммов образовывали биопленки высокой плотности, 7 штаммов – биопленки средней плотности, а один штамм – биопленки слабой плотности (табл. 1).

Антибактериальная активность диоксицина и препарата «Носолин-ультра капли назальные» против биопленок возбудителей ЛОР-инфекций. Препарат диоксицина проявлял антимикробную активность против сформированных биопленок всех использованных в работе штаммов микроорганизмов (МБК от 0,08 до 2,5 мг/мл), кроме штаммов *S. pyogenes* (МБК > 5 мг/мл) (см. рис.1). Комплексный препарат «Носолин-ультра, капли назальные» также проявлял высокий уровень активности биопленок (МБК от 0,02 до 0,31 мг/мл), кроме штаммов *S. pyogenes* (МБК >2,5 мг/мл) (табл. 2). Использованный методический подход не позволил определить значение МБК для штаммов стрептококков.

Отмечено, что МБК диоксицина для всех изученных в данном исследовании штаммов микроорганизмов в состоянии биопленок были несколько ниже или одинаковы, по сравнению с данным показателем для планктонных клеток, кроме штамма *M. catarrhalis* №1, у которого отмечено обратное соотношение (см. табл. 2). Наибольшая разница между значениями МБК, как для диоксицина, так и для препарата «Носолин-ультра, капли назальные» против планктонных клеток и биопленок отмечена для штаммов *S. aureus* и *C. albicans*, клетки которых в планктонном состоянии были менее чувствительны к антимикробному действию этих препаратов, но в состоянии биопленок были более чувствительны.

Динамика формирования устойчивости к диоксицину у возбудителей ЛОР-инфекций. Формирование устойчивости к диоксицину изучали на референс-штаммах *K. pneumoniae* ATCC13883, *P. aeruginosa* ATCC10145, *S. aureus* ATCC25923 и *C. albicans* ATCC10231, представителях видов микроорганизмов, которые относятся к наиболее характерным возбудителям инфекций верхних дыхательных путей.

Штамм *S. aureus* ATCC25923 в условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций диоксицина сформировал высокий уровень устой-

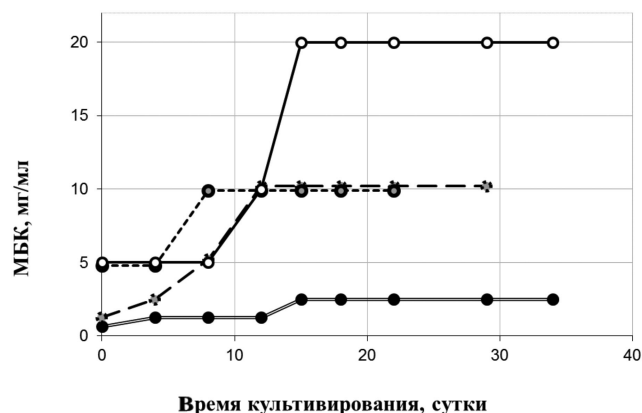
Антимикробная активность диоксидина и препарата «Носолин-ультра, капли назальные» против планктонных клеток и биопленок штаммов микроорганизмов – возбудителей ЛОР-инфекций

Штаммы микроорганизмов	МБК, мг/мл			
	Диоксидин		«Носолин-ультра, капли назальные»	
	Планктонные клетки	Биопленки	Планктонные клетки	Биопленки
Референс-штаммы				
<i>S. pyogenes</i> NCTC8198	5,0±0	>5,0	2,5±0	>2,5
<i>S. agalactiae</i> ATCC12386	5,0±1,4	>5,0	>2,5	2,5±0
<i>S. aureus</i> ATCC25923	5,0±1,4	2,5±0	1,25±0	1,25±0
<i>S. saprophyticus</i> CCM883	5,0±0	1,25±0,4	>2,5	0,63±0
<i>S. epidermidis</i> ATCC14990	2,5±0	1,25±0	>2,5	0,31±0,09
<i>M. catarrhalis</i> ATCC25238	0,31±0,09	0,16±0	0,31±0,09	0,02±0
<i>H. influenzae</i> ATCC10211	0,08±0,02	0,08±0,02	0,04±0,12	0,04±0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC10145	1,25±0	0,63±0,2	0,63±0,2	0,16±0,05
<i>K. pneumoniae</i> ATCC13883	0,63±0	0,16±0	0,63±0,2	0,16±0
<i>P. vulgaris</i> ATCC9484	0,63±0,2	0,31±0,09	0,31±0	0,31±0
<i>C. albicans</i> ATCC10231	5,0±0	1,25±0	>2,5	1,25±0
Клинические штаммы				
<i>S. pyogenes</i> SN345	>5,0	>5,0	2,5±0,7	>2,5
<i>S. aureus</i> 7775	5,0±1,4	0,63±0	2,5±0,7	0,63±0
<i>M. catarrhalis</i> №1	0,16±0,05	0,63±0	0,16±0	0,16±0,05
<i>M. luteus</i> №1	2,5±0,7	1,25±0,7	2,5±0,7	0,16±0
<i>P. aeruginosa</i> B-86/17	0,63±0,2	0,63±0	0,16±0	0,16±0
<i>A. pittii</i> №6	5,0±0	0,31±0	>2,5	0,31±0
<i>K. pneumoniae</i> B-86/18	0,63±0,2	0,08±0	0,16±0,05	0,08±0
<i>P. mirabilis</i> B-417/16	0,31±0,09	0,08±0,02	0,31±0,09	0,16±0,05
<i>C. albicans</i> №16	5,0±0	1,25±0	2,5±0	0,16±0

чивости к этому препарату (МБК=20 мг/мл) в течение 34 дней (8 пассажей). Этот уровень устойчивости в два раза превысил концентрацию диоксидина в препарате «Носолин-ультра, капли назальные», а уровень МБК этого штамма в 4 раза, по сравнению с исходным. Для штамма *P. aeruginosa* ATCC1014 за 18 сут (5 пассажей) культивирования в условиях селективного давления диоксидина произошло повышение МБК диоксидина в 8 раз – до значения 10 мг/мл, то есть препарат «Носолин-ультра, капли назальные», содержащий 10 мг/мл диоксидина, эффективен против планктонных клеток этого штамма. Для штамма *C. albicans* ATCC10231 за 39 сут (10 пассажей) культивирования в условиях селективного давления диоксидина, значение МБК диоксидина увеличилось в 2 раза, до 10 мг/мл, что также говорит об эффективности комплексного препарата против данного штамма. Для штамма *K. pneumoniae* ATCC13883 за 29 сут (7 пассажей) культивирования в присутствии повышающихся концентраций диоксидина произошло повышение МБК препарата в 4 раза – до значения 2,5 мг/мл, не превышающего концентрацию диоксидина в препарате «Носолин-ультра, капли назальные» (рис. 2).

Таким образом, в ходе исследования показано, что селективное давление диоксидина не привело к формированию у *P. aeruginosa*, *C. albicans* и *K. pneumoniae* вариантов, устойчивых к диоксидину в концентрациях, превышающих таковую в препарате «Носолин-ультра, капли назальные». Напротив, референс-штамм *S. aureus* в течение 34 дней (8 пассажей) сформировал устойчивый вариант к этому препарату.

Обсуждение. Проведено исследование *in vitro* антибактериальной активности комплексного препарата «Но-



●— *K. pneumoniae* ATCC 13883 -x- *P. aeruginosa* ATCC 10145
-○- *C. albicans* ATCC 10231 -○- *S. aureus* ATCC 25923

Рис. 2. Динамика повышения показателя минимальных бактерицидных концентраций диоксидина для штаммов *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC10145, *C. albicans* ATCC10231, и *K. pneumoniae* ATCC13883.

солин-ультра, капли назальные», а также его основного антибактериального компонента – диоксидина – против возбудителей ЛОР-инфекций человека разных таксономических групп: грамположительных бактерий (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* и *S. epidermidis*), грамотрицательных бактерий (*M. catarrhalis*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *A. pittii* и *P. mirabilis*) и дрожжеподобных грибов (*C. albicans*).

Показано, что изучаемый препарат проявлял более высокий уровень активности против грамотрицательных бактерий, чем против грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов, что согласуется с данными других исследователей, которые ранее сообщали о незначительной активности диоксидина или полном ее отсутствии в отношении некоторых грамположительных бактерий (*Staphylococcus spp.*, *S. aureus* и *S. pyogenes*), а также дрожжеподобных грибов рода *Candida* [29, 30]. Важно, что тестируемый препарат антисептика оказался эффективным против клинических штаммов, несущих эпидемически значимые генетические детерминанты антибиотикорезистентности – гены бета-лактамаз bla_{TEM-1} , bla_{SHV-11} , $bla_{CTX-M-15}$ и интегроны классов 1 и 2 с генными кассетами устойчивости к аминогликозидам и сульфаниламидам

Интересно, что биопленки большинства использованных тест-штаммов микроорганизмов оказались более чувствительны к диоксидину и комплексному препарату «Носолин-ультра, капли назальные», чем планктонные клетки, что важно с учетом знаний о том, что многие возбудители ЛОР-инфекций в организме человека формируют биопленки [19]. Полученные нами данные согласуются с опубликованными ранее данными других авторов, которые сообщали, что диоксидин подавлял, например, рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC9027 [31, 32].

В ходе исследования проведен анализ динамики формирования устойчивости к диоксидину у микроорганизмов – возбудителей ЛОР-инфекций разных таксономических групп. Только один штамм *S. aureus* ATCC25923 сформировал устойчивый к диоксидин-содержащему препарату «Носолин-ультра, капли назальные» вариант в ходе эксперимента, а штаммы *P. aeruginosa* ATCC10145, *K. pneumoniae* ATCC13883, и *C. albicans* ATCC10231 таких вариантов не сформировали, что указывает на возможность использования изучаемого препарата при длительной терапии ЛОР-органов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016-2020 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 6-9, 12, 15, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 28 см. REFERENCES)

1. Афанасьева И.А. Комплексная терапия ОРВИ. *Русский медицинский журнал*. 2007; 15 (18): 1358-60.
2. Геппе Н.А., Дронов И.А., Малявина У.С. Рациональный подход к назначению и выбору антибактериальной терапии при инфекциях дыхательных путей и ЛОР-органов у детей. *Клиническая фармакология*. 2008; 1: 53-6.
3. Шишмаков А.А., Колесник Д.С., Толеуова Ж.Г.-К., Колодзиева В.В., Лебедева Е.А., Гончаров А.Е., и др. Эпидемиологическая оценка факторов риска распространения антибиотикорезистентных штаммов возбудителей инфекций верхних дыхательных путей и ЛОР-органов у детей. *Пермский медицинский журнал*. 2017; 34(4): 54-9.
4. Лучихин, Л.А., Миронов А.А., Гуров А.В. Медикаментозная терапия при тяжелых гнойно-воспалительных поражениях ЛОР-органов и их осложнениях. *Вестник оториноларингологии*. 2001; 4: 66-8.
5. Рязанцев С.В., Рябова М.А. ЛОР-инфекция вчера, сегодня, завтра. Эволюция возбудителей и прогресс терапии. *Эффективная фармакотерапия*. 2017; 30: 38-43.

10. Свиштушкин В.М., Никифорова Г.Н., Петрова Е.И. Бактериальные инфекции ЛОР-органов: деликатная терапия. *Медицинский совет*. 2017; 8: 58-63.
11. Лопатин А.С. Местные антимикробные препараты в лечении инфекций верхних дыхательных путей. *Клиническая антимикробная химиотерапия*. 2000; 2(2): 58-61.
13. Туровский А.Б., Карюк Ю.А., Кондрашина В.В. Антибактериальная терапия инфекций ЛОР-органов. *Клиницист*. 2013; 3(4):98-103.
14. Федин А.В., Баранова Н.И., Дружинина Т.А., Починина Н.К. Иммунологические аспекты патогенеза острого бактериального риносинусита: выявление критериев хронизации процесса. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2014; 4:56-60.
16. Еремин С.А., Рязанцев С.В., Коноплев О.И. Рациональный выбор антибактериального препарата для терапии ЛОР-органов в амбулаторной практике. *Медицинский совет*. 2018; 20: 8-12.
17. Коваленко Н.И., Замазий Т.Н., Новикова И.В., Тараненко Г.П. Анализ антибиотикорезистентности возбудителей бактериальных инфекций ЛОР-органов. *Проблемы здоровья и экологии*. 2017; 53(3):31-5.
18. Сидоренко С.В., Никифорова Г.Н., Корнева О.В., Рязанцев С.В. Международные рекомендации по терапии ЛОР-инфекций: что применимо в российской действительности. *Эффективная фармакотерапия*. 2016; 20:28-36.
20. Тулупов, Д. А., Карпова Е. П. О роли бактериальной микрофлоры в этиологии хронического аденоидита у детей. *Вопросы современной педиатрии*. 2014; 13(1): 172-5.
23. Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Храмов М.В., Шепелин А.П. Отечественные питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 5: 59-64.
26. Детушева Е.В., Родин В.Б., Слукин П.В., Чугунов В.А., Ершова О.Н., Александрова И.А. и др. Чувствительность нозокомальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(1): 57-66.
29. Падейская Е.Н. Сложные вопросы антимикробной химиотерапии. *Инфекционная и антимикробная терапия*. 2017; 3(5): 31-6.
30. Яковлев В.П., Яковлева С.В. Руководство «Рациональная антимикробная фармакотерапия». Москва: Литтерра; 2015.
31. Козлов С.Н., Страчунский Л.С., Белоусова Ю.Б. *Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей*. Смоленск: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии; 2007.
32. Плотников Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микроорганизмов-возбудителей формировать биопленку. *Новости хирургии*. 2014; 22(5): 575-81.

REFERENCES

1. Afanasyeva I.A. ARVI complex therapy. *Russkii meditsinskiy zhurnal*. 2007; 15 (18): 1358-60. (in Russian)
2. Geppe N.A., Dronov I.A., Malyavina U.S. A rational approach to the appointment and selection of antibiotic therapy for infections of the respiratory tract and ENT organs in children. *Klinicheskaya farmakologiya*. 2008; 1: 53-6. (in Russian)
3. Shishmakov A.A., Kolesnik D.S., Toleuova ZH.G.-K., Kolodzhieva V.V., Lebedeva E.A., Goncharov A.E., i dr. Epidemiological assessment of risk factors for the spread of antibiotic-resistant strains of pathogens of upper respiratory tract infections and ENT organs in children. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 34 (4): 54-9. (in Russian)
4. Luchihin L.A., Mironov A.A., Gurov A.V. Drug therapy for severe purulent-inflammatory lesions of the ENT organs and their complications. *Vestnik otorinolaringologii*. 2001; 4: 66-8. (in Russian)
5. Ryazantsev S.V., Ryabova M.A. ENT infection yesterday, today, tomorrow. Pathogen evolution and treatment progress. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2017; 30: 38-43. (in Russian)

6. Luk L.J., DelGaudio J.M. Topical Drug Therapies for Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2017; 50(3): 533-43.
7. Chow A.W., Benninger M.S., Brook I., Brozek J.L., Goldstein E.J., Hicks L.A. et al. Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(8): 72-112.
8. Russell M.D., Russell M.S. Urgent Infections of the Head and Neck. *Med. Clin. North Am.* 2018; 102(6):1109-20.
9. Liu Z., Norman G., Iheozor-Ejiofor Z., Wong J.K., Crosbie E.J., Wilson P. Nasal decontamination for the prevention of surgical site infection in *Staphylococcus aureus* carriers. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 5:CD012462.
10. Svistushkin V.M., Nikiforova G.N., Petrova E.I. Svistushkin V.M., Nikiforova G.N., Petrova E.I. Bacterial infections of ENT organs: delicate therapy. *Meditsinskiy sovet.* 2017; 8: 58-63. (in Russian)
11. Lopatin A.S. Local antimicrobials in the treatment of upper respiratory tract infections. *Klinicheskaya antimikrobnaya khimioterapiya.* 2000; 2 (2): 58-61. (in Russian)
12. Cordesmeier R., Kauffmann P., Markus T., Sömmer C., Eiffert H., Bremmer F. et al. Bacterial and histopathological findings in deep head and neck infections: a retrospective analysis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2017; 124(1):11-5.
13. Turovskiy A.B., Karyuk Yu.A., Kondrashina V.V. Antibacterial therapy of infections of ENT organs. *Klinitsist.* 2013; 3 (4): 98-103. (in Russian)
14. Fedin A.V., Baranova N.I., Druzhinina T.A., Pochinina N.K. Immunological aspects of the pathogenesis of acute bacterial rhinosinusitis: identification of criteria for the chronicity of the process. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2014; 4: 56-60. (in Russian)
15. Viveros N.M. Biofilms en otorrinolaringologia. *Acta Otorrinolaringol. Esp.* 2014; 65(1): 47-52.
16. Eremin S.A., Ryazancev S.V., Konoplyov O.I. The rational choice of an antibacterial drug for the treatment of ENT organs in outpatient practice. *Meditsinskiy sovet.* 2018; 20: 8-12. (in Russian)
17. Kovalenko N.I., Zamazyi T.N., Novikova I.V., Taranenko G.P. Analysis of antibiotic resistance of pathogens of bacterial infections of ENT organs. *Problemy zdorov'ya i ekologii.* 2017; 53 (3): 31-5. (in Russian)
18. Sidorenko S.V., Nikiforova G.N., Korneva O.V., Ryazancev S.V. Analysis of antibiotic resistance of pathogens of bacterial infections of ENT organs. *Effektivnaya farmakoterapiya.* 2016; 20: 28-36. (in Russian)
19. Calo L., Passali G.C., Galli J., Fadda G., Paludetti G. Role of biofilms in chronic inflammatory diseases of the upper airways. *Adv. Otorhinolaryngol.* 2011; 72: 93-6.
20. Tulupov D. A., Karpova E. P. . On the role of bacterial microflora in the etiology of chronic adenoiditis in children. *Voprosy sovremennoy pediatrii.* 2014; 13 (1): 172-5. (in Russian)
21. Kanagalingam J., Feliciano R., Hah J.H., Labib H., Le T.A., Lin J.C. Practical use of povidone-iodine antiseptic in the maintenance of oral health and in the prevention and treatment of common oropharyngeal infections. *Int. J. Clin. Pract.* 2015; 69(1):1247-56.
22. Hathroubi S., Mekni M. A., Domenico P., Nguyen D., Jacques M. Biofilms: Microbial Shelters Against Antibiotics. *Microb. Drug Resist.* 2017; 23(2): 147-56.
23. Podkopaev YA.V., Domotenko L.V., Morozova T.P., Hramov M.V., SHepelin A.P. Domestic culture media for the diagnosis of purulent bacterial meningitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 5: 59-64. (in Russian)
24. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28(3): 449-61.
25. Rodrigues L.B., Dos Santos L.R., Tagliari V.Z., Rizzo N.N., Trenhago G., de Oliveira A.P., Goetz F., do Nascimento V.P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz. J. Microbiol.* 2010; 41(4): 1082-5.
26. Detusheva E.V., Rodin V.B., Slukin P.V., CHugunov V.A., Ershova O.N., Aleksandrova I.A. et al. Sensitivity of nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Proteus mirabilis* to a chlorhexidine-based antiseptic. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2015; 17 (1): 57-66. (in Russian)
27. Braoudaki M., Hilton A. C. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1): 73-8.
28. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V. et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health.* 2018; 112 (3): 142-51.
29. Padeyskaya E.N. Challenges of antimicrobial chemotherapy. *Infektsionnaya i antimikrobnaya terapiya.* 2017; 3 (5): 31-6. (in Russian)
30. Yakovlev V.P., YAKovleva S.V. Guide "Rational antimicrobial pharmacotherapy" [Rukovodstvo. Ratsional'naya antimikrobnaya farmakoterapiya]. Moscow: Litterra; 2015. (in Russian)
31. Kozlov S.N., Strachunskij L.S., Belousova Yu.B. A Practical Guide to Anti-Infectious Chemotherapy. Lying. antimicro. chemo. hands for doctors. Smolensk: Mezhtseional'naya assotsiatsiya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoy khimioterapii; 2007. (in Russian)
32. Plotnikov F.V. Comprehensive treatment of patients with purulent wounds, depending on the ability of microorganisms-pathogens to form a biofilm. *Novosti khirurgii.* 2014; 22(5): 575-81. (in Russian)

Поступила 28.11.19

Принята к печати 19.12.19